

**УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ «ВИТЕБСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
ОРДЕНА ДРУЖБЫ НАРОДОВ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

УДК: 616.9:616-008.8:616-035:616-093:616-097

**ЖИЛЬЦОВ
Иван Викторович**

**БИОЛОГИЧЕСКАЯ РЕЗИСТЕНТНОСТЬ К БЕТА-ЛАКТАМНЫМ
АНТИБИОТИКАМ ПРИ СОЦИАЛЬНО ЗНАЧИМЫХ ИНФЕКЦИОН-
НЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ПРИРОДЫ:
МЕХАНИЗМЫ, КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ И ПУТИ ПРЕОДОЛЕНИЯ**

**Автореферат диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук**

**по специальности:
14.01.09 – инфекционные болезни**

Витебск, 2012

ВВЕДЕНИЕ

Принято считать, что антибиотики бета-лактамной группы – самый удачный класс антибактериальных препаратов с начала антибиотической эры [Pérez-Llarena, 2009]. Тем не менее, за последние 60 лет частота встречаемости патогенных микроорганизмов, устойчивых к бета-лактамам, и уровень этой устойчивости неуклонно возрастали. Многие ученые считают, что антибиотики данной группы вскоре окажутся неспособными бороться с тяжелыми бактериальными инфекциями [S. Abeylath, 2008]. Устойчивость бактерий к антибиотикам бета-лактамного ряда и ингибиторам бета-лактамаз – непрерывно растущая проблема, приводящая к снижению эффективности лекарств, образующих краеугольный камень арсенала клиницистов [M. Helfand, 2003].

Тем не менее, вплоть до настоящего времени антибиотикоустойчивость болезнетворных бактерий рассматривалась лишь как приспособительная реакция микроорганизмов. При этом исследователи и клиницисты традиционно не принимают во внимание, что человеческий организм, со своей стороны, также небезразличен к введению антибиотиков. Так, показано, что гемолизированная кровь может разрушать 3-ацетоксиметил-цефалоспорины (цефалотин, цефотаксим) [E. Walter, 1980]. Известно также, что карбапенемы (в частности, имипенем) разрушаются почечными дегидропептидазами [R. Moellering, 1989]. Более того, доказано, что аналог карбапенемов (2-метилпенем-3-карбоксилловая кислота) разрушается альбумином человеческой крови [H. Bruderlein, 1981].

Феномен собственной бета-лактамазной активности человеческой крови был замечен достаточно давно. В 1972 г. группа исследователей компании Glaxo Research Ltd, изучая свойства синтезированного ими хромогенного цефалоспориноид нитроцефина, описала значимый распад его бета-лактамной связи под воздействием сыворотки человеческой крови, причем было показано, что данное свойство характерно в первую очередь для альбумина [H. Callaghan, 1972]. Тем не менее, углубленное исследование данного феномена не производилось, реакция была сочтена неспецифической, и обнаруженное явление было забыто на много лет. В 1994 г. научный коллектив во главе с Б. Нерли повторно описал феномен интенсивного распада нитроцефина под воздействием человеческого сывороточного альбумина (ЧСА) [B. Nerli, 1994-95]. Попытка доказать распад некоторых других антибиотиков цефалоспоринового ряда (в частности, цефтриаксона, цефоперазона и цефсулодина) под воздействием ЧСА не увенчалась успехом, клиническое значение феномена не исследовалось, и в результате явление необычно высокой собственной бета-лактамазной активности человеческой крови осталось незамеченным научным сообществом.

Особняком стоит феномен формирования в человеческом организме иммуноглобулинов, обладающих бета-лактамазной активностью, т.н. «абзимов»,

или каталитических антител. Исследования, выполненные в ведущих научных лабораториях мира, убедительно показали, что антитела могут вмешиваться в лиганд-рецепторные взаимодействия любой природы [И.П. Ашмарин, 1989; K. Hilyard, 1989]. В ряде исследований было продемонстрировано наличие у иммуноглобулинов ферментоподобной («абзимной») активности [А.Я. Кульберг, 1989; E. Shuanenstein, 1986; R. Lerner, 1990].

Показано, что при инфекционных заболеваниях, вызванных бактериями, продуцирующими бета-лактамы, возможно образование антител к активному центру последних [B. Giwerzman, 1994]. Согласно теории иммунологических сетей Эрне, вслед за этим формируются антитела второго порядка, антигеном для которых является участок связывания антител первого порядка [N. Jette, 1974; M. Zouali, 1994]. Такие антитела способны гидролизовать бета-лактамы. Возможность формирования *in vivo* (при иммунизации мышей пенициллиназой) абзимов, обладающих бета-лактамазной активностью, была экспериментально доказана [S. Lefevre, 2001; B. Avale, 1998, 2000; H. Debat, 2001].

С учётом вышесказанного, появляются новые подходы к объяснению некоторых наблюдаемых в клинике феноменов. Так, при ряде инфекционных заболеваний описана клиническая неэффективность различных бета-лактамных антибиотиков, которые *in vitro* эффективно подавляли жизнедеятельность возбудителей соответствующих инфекций [А.М. Шустер, 1991].

Таким образом, в человеческом организме присутствует ряд эндогенных факторов, ускоряющих деградацию и элиминацию бета-лактамных антибиотиков. Несмотря на несколько ранее выполненных исследований феномена высокой бета-лактамазной активности человеческой крови, неясно, какие еще антибактериальные препараты, кроме нитроцефина, способны распадаться под ее воздействием, каков механизм катализа, и, в целом, имеет ли бета-лактамазная активность крови какое-либо клиническое значение. Перечень инфекционных заболеваний, при которых в человеческой крови была выявлена бета-лактамазная активность, до выполнения настоящей работы был очень невелик, а реальный вклад различных белковых фракций в суммарную бета-лактамазную активность сыворотки крови в норме и при патологии не изучался, что и вызвало необходимость проведения углубленных исследований.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Связь работы с крупными научными программами, темами

Настоящее диссертационное исследование было выполнено в рамках темы НИР кафедры инфекционных болезней Витебского государственного медицинского университета «Разработать и внедрить в Республике Беларусь рациональные методы комплексной терапии наиболее распространенных инфекци-

онных заболеваний», номер государственной регистрации 20073717, утвержденной на 2007-2011 годы.

Кроме того, исследования по теме диссертационной работы выполнялись в рамках следующих крупных научных проектов:

1. Темы ФФИ «Бета-лактамазная активность поликлональных IgG и ее патогенетическое значение в развитии антибиотикоустойчивости при бактериальных инфекциях» (№ государственной регистрации 20082143, договор Б08М-009). Данный проект выполнялся в срок с 01.04.2008 г. по 31.03.2010 г., причем автор диссертации являлся его научным руководителем;

2. Темы ГНТП «Разработать тест-систему для определения и количественной оценки бета-лактамазной активности биологических субстратов с целью коррекции антибактериальной терапии» (№ государственной регистрации 2009-1036, договор 02.24/09). Срок выполнения данного проекта – с 01.01.2009 г. по 31.12.2013 г., автор диссертации является его ответственным исполнителем. Научный руководитель темы ГНТП – д.м.н., профессор В.М. Семенов.

Вышеупомянутый проект является победителем (1 место) республиканского конкурса инновационных проектов 2011 г., проводимого ГКНТ Республики Беларусь, в номинации «лучший инновационный проект».

Цель и задачи исследования

Цель исследования: оценить клиническое значение биологической резистентности к бета-лактамам антибиотикам при социально значимых инфекционных заболеваниях для оптимизации антибактериальной терапии.

Для решения поставленной цели были определены следующие задачи:

1. Установить природу бета-лактамазной активности человеческой крови, оценить вклад различных факторов в суммарную бета-лактамазную активность сыворотки крови;

2. Установить и описать механизм катализа гидролитического распада бета-лактамных антибиотиков под воздействием факторов человеческой крови;

3. Разработать тест-систему для качественной и количественной оценки бета-лактамазной активности в биологических субстратах (сыворотке крови, мокроте, спинномозговой жидкости) и бактериальных суспензиях;

4. Оценить частоту встречаемости и уровень бета-лактамазной активности крови при инфекционных заболеваниях различной этиологии;

5. Определить клиническую значимость бета-лактамазной активности сыворотки крови и степень ее влияния на эффективность антибактериальной терапии с применением бета-лактамных антибиотиков;

6. Разработать действенные методы преодоления бета-лактамазной активности сыворотки крови для повышения эффективности этиотропной тера-

пии, проводимой пациентам с социально значимыми бактериальными инфекциями с применением бета-лактамных антибиотиков;

7. Оценить клиническое значение бета-лактамазной активности других биологических субстратов (мокроты, спинномозговой жидкости) и влияние указанной активности на эффективность антибактериальной терапии, проводимой антибиотиками бета-лактамного ряда пациентам с социально значимыми бактериальными инфекциями (пневмониями, рожистым воспалением, острыми гнойными тонзиллитами, гнойными менингитами);

8. Оценить наличие и уровень бета-лактамазной активности бактериальных суспензий с применением разработанной тест-системы и сопоставить чувствительность, специфичность, воспроизводимость и диагностическую ценность получаемых результатов с данными, полученными при применении общепринятых методов бактериологического анализа.

Объекты исследования: 1) 501 проба сыворотки крови; 2) 163 образца мокроты, собранной при фибробронхоскопии; 3) 182 пробы спинномозговой жидкости (СМЖ); 4) 131 образец суспензий чистых культур микроорганизмов.

Предмет исследования: собственная бета-лактамазная активность сыворотки человеческой крови; бета-лактамазная активность других биологических жидкостей (СМЖ, мокроты); устойчивость клинических изолятов патогенных микроорганизмов к антибиотикам бета-лактамного ряда.

Положения, выносимые на защиту

1. У значительной части пациентов с социально значимыми инфекционными заболеваниями регистрируется высокий уровень бета-лактамазной активности сыворотки крови, оказывающий влияние на эффективность антибактериальной терапии с применением антибиотиков бета-лактамного ряда. При этом «биологическая» резистентность к бета-лактамным антибиотикам на 70-90% обусловлена свойствами сывороточного альбумина, на 10-30% – свойствами поликлональных IgG субклассов 1, 2 и 4. Бета-лактамазная активность ЧСА зависит от pH среды (оптимум при 9,0 с резким увеличением в интервале 7,0-8,0), ионной силы раствора (максимальная при уровне ионной силы, нормальном для человеческой крови), температуры тела (существенный рост при повышении до 39-40°C), что необходимо учитывать при применении бета-лактамных антибиотиков для лечения пациентов с бактериальными инфекциями;

2. Бета-лактамазная активность проявляется при условии сохранности третичной структуры альбумина. В составе молекулы альбумина имеется активный центр, образованный боковыми радикалами аминокислот TYR 148, TYR 150, LYS 195, GLN 196, LYS 199, CYS 200, ARG 218, ARG 222, VAL 241, HIS 242, CYS 245, ARG 257, ALA 291 и ASP 451 и отвечающий за связывание

ЧСА с бета-лактамами антибиотиками и clavulanic acid. Clavulanic acid, to a lesser extent, is capable of inhibiting beta-lactamase activity of serum, which is necessary to take into account when applying inhibitor-protected beta-lactam antibiotics for the treatment of patients with bacterial infectious pathology;

3. Beta-lactamase activity of serum is manifested in the relationship of all classes of antibiotics of the beta-lactam series (penicillins, cephalosporins, carbapenems, monobactams), its clinical significance is directly proportional to the level of nitrocefin degradation. A proposed algorithm for the application of beta-lactam antibiotics for the treatment of patients with bacterial infections depends on the level of nitrocefin degradation in their serum, which allows to increase the effectiveness of etiotropic therapy and reduce financial costs of treatment;

4. In patients with socially significant bacterial infections (pneumonia, acute purulent tonsillitis, other respiratory tract diseases, bacterial damage to the CNS), having a high level of beta-lactamase activity of serum ($\geq 68,2\%$), replacement of beta-lactam antibiotics with antibacterial drugs from other pharmacological groups or inhibitor-protected beta-lactams leads to a significant (within 4,6 days), statistically significant reduction in the duration of hospitalization compared with analogous patients with low serum beta-lactamase activity, which ensures economy of financial resources in the amount of up to 235.300 u.e. per 1000 treated patients;

5. A test system «BioLactam», designed for quantitative assessment of beta-lactamase activity of biological substrates (serum, sputum, CSF) and bacterial suspensions. Beta-lactamase activity of sputum $\geq 20\%$ significantly increases the probability of failure of empirical antibacterial therapy of pneumonia 2,0-3,1 times. At beta-lactamase activity of CSF $\geq 20\%$ the probability of failure of empirical etiotropic therapy of bacterial meningitis increases 1,9-3,2 times. Established values of beta-lactamase activity in the above-listed biological substrates with a high degree of reliability indicate the need for designation of inhibitor-protected beta-lactams or antibiotics from other pharmacological groups with an analogous spectrum of activity for the treatment of patients with corresponding bacterial infections;

6. The developed test system «BioLactam» can be applied for the assessment of the production of beta-lactamase by clinical isolates of bacteria in bacterial suspensions. At the level of beta-lactamase activity of bacterial suspension exceeding 14,2%, it is recommended to stop the choice on inhibi-

тор-защищенных бета-лактамах либо цефалоспоринов 3-4 поколения, при уровне активности более 26,5% – на цефалоспоринов 3-4 поколения, а при активности, превышающей 81,2%, использование бета-лактамов нецелесообразно. Предложенный метод сопоставим по результативности с общепринятым диско-диффузионным методом анализа, но существенно дешевле, обладает более высокой точностью и воспроизводимостью и позволяет получать результат значительно быстрее (за 45-60 минут).

Личный вклад соискателя

Постановка проблемы, формулировка цели и задач исследования проведены совместно с научным консультантом. Автором лично выполнены анализ научной литературы, сбор и анализ медицинской документации, отбор образцов исследуемых биологических материалов, а также практически все лабораторные исследования (ВЭЖХ-анализ – при помощи сотрудников лаборатории стандартизации контроля качества медицинских препаратов г. Витебска), статистическая обработка материалов исследования, анализ полученных результатов и их изложение в виде диссертационного материала, внедрение результатов научной работы в практику здравоохранения и учебный процесс. Производство тест-системы «БиоЛактам» было развернуто на базе ООО «Научно-производственное предприятие «Витаген»; ТУ ВУ 391353648.001–2011 были составлены при помощи сотрудников данного предприятия.

Все публикации написаны лично автором, среди соавторов – научный консультант, сотрудники кафедры микробиологии УО ВГМУ, ЦНИЛ ВГМУ, эндоскопического отделения БСМП г. Витебска и лаборатории стандартизации контроля качества медицинских препаратов г. Витебска. В выполнении ряда фрагментов работы, связанных со сбором образцов исследуемых биологических материалов, а также с проведением лабораторных и инструментальных исследований, автору оказывали помощь сотрудники кафедры инфекционных болезней УО ВГМУ, сотрудники клинической и бактериологической лабораторий УЗ ВОКИБ, а также врачи эндоскопического отделения БСМП г. Витебска, за что автор диссертации выражает им свою искреннюю признательность.

Апробация результатов диссертации

Результаты исследования и основные положения диссертации были доложены и обсуждены:

1. На ежегодных научных сессиях (с 59-ой по 64-ю) сотрудников Витебского государственного медицинского университета (Витебск, 2004-2009 гг.);
2. На пленарном заседании 65-ой научной сессии сотрудников Витебского государственного медицинского университета (Витебск, 2010 г.);

3. На двух конференциях «Актуальные вопросы современной инфектологии», проводимых на базе Главного военно-методического клинического центра МО Украины (Киев, 2010-11 гг.);

4. На заседании Первого конгресса Евро-Азиатского общества по инфекционным болезням (С.-Петербург, 2010 г.);

5. На заседании секции Первой международной научно-практической школы по инфектологии, проводимой на базе Витебского государственного медицинского университета (Витебск, 2011 г.).

6. В виде постерной презентации – на 27-м ежегодном съезде Европейского общества детских инфекционистов (Брюссель, 2009 г.);

7. На юбилейной научно-практической конференции «Инфекционные болезни: проблемы, достижения и перспективы», посвященной 115-летию кафедры инфекционных болезней Военно-медицинской академии имени С.М. Кирова (С.-Петербург, 2011 г.);

8. На юбилейной научно-практической конференции «Инфекционные болезни: проблемы и пути их решения», посвященной 50-летию образования научно-исследовательского института эпидемиологии, микробиологии и инфекционных заболеваний Министерства Здравоохранения Республики Узбекистан (Ташкент, 2011 г.).

По материалам диссертационной работы утверждено 13 рационализаторских предложений. Также получено 2 уведомления Национального центра интеллектуальной собственности о положительном результате предварительной экспертизы по заявкам на выдачу патентов на изобретения «Способ количественной оценки бета-лактамазной активности биологических жидкостей и бактериальных взвесей» и «Способ расфасовки нитроцефина во флаконы с сохранением его химических свойств при помощи лиофильной сушки».

Опубликованность результатов диссертации

По теме диссертации опубликовано 49 научных работ с общим объемом 24,2 авторских листа, в том числе 27 научных работ объемом 9,81 авторского листа, соответствующих пункту 18 Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий в Республике Беларусь, 19 статей объемом 1,75 авторских листа в сборниках научных трудов материалов конференций и съездов, 2 инструкции по применению объемом 1,0 авторский лист, утвержденные Министерством здравоохранения Республики Беларусь, 1 технические условия на тест-систему «БиоЛактам» объемом 0,59 авторских листа, утвержденные УП «Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении» Республики Беларусь, а также 1 монография объемом 11,04 авторских листа.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, общей характеристики работы, обзора литературы, 3 глав собственных исследований, заключения, библиографического списка, содержащего список использованных источников и список публикаций соискателя, а также приложений. Текстовая часть составляет 261 страницу компьютерного текста, 27 приложений занимают 46 страниц. Библиографический список включает список использованных источников, содержащий 285 работ, из которых 44 работы – отечественных авторов, и 241 – зарубежных, а также список публикаций автора, включающий 49 источников (объем, занимаемый библиографическим списком – 5 страниц). Работа иллюстрирована 28 таблицами (объем, занимаемый таблицами – 14 страниц) и 63 рисунками (объем, занимаемый иллюстрациями – 32 страницы).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В аналитическом обзоре литературы представлен анализ доступных литературных данных, характеризующих современные представления о патогенезе устойчивости бактерий к антибиотикам бета-лактаминового ряда, а также об известных факторах макроорганизма, способных независимо от бактерий осуществлять гидролиз бета-лактаминных антибиотиков. Приведены сведения о современном состоянии резистентности основных бактериальных патогенов к антибактериальным препаратам, принадлежащим к классу бета-лактамов.

Материалы и методы исследования

Клиническое исследование имело «срезовой» (cross-sectional) дизайн. Исследование являлось проспективным. Планирование исследования было выполнено в соответствии с действующими международными рекомендациями, утверждающими стандарты доказательной медицины [J. Giesecke, 2002]. В дизайне исследования была предусмотрена контрольная группа.

Размер изучаемой выборки определялся в соответствии с рекомендациями, изложенными в «Руководстве по современной эпидемиологии инфекционных заболеваний» [J. Giesecke, 2002]. Рассчитанный минимальный размер отдельной группы сравнения составлял 40 человек при мощности исследования 0,8 и 53 человека при мощности исследования 0,9.

Общее количество учтенных случаев, прошедших статистическую обработку, составило 501. В число указанных лиц вошли: 53 пациента с рожистым воспалением, 62 пациента с бактериальными пневмониями, 51 пациент с аденовирусной инфекцией, 19 пациентов с менингитами (9 – с вирусными, 10 – с бактериальными), 78 пациентов с острым гнойным тонзиллитом, 32 пациента с эпидемическим гриппом А (H1N1), т.н. «свиным»; в качестве группы сравнения

(пациенты с неинфекционной патологией) – 61 пациент с различной травматологической патологией, но без признаков инфекционных заболеваний; в качестве группы сравнения (пациенты с тяжелой инфекционной патологией, не получающие бета-лактамы антибиотиков в составе терапевтических схем) – 63 пациента с туберкулезом легких; в качестве контрольной группы – 82 практически здоровых военнослужащих, проходящих срочную службу в Витебской воздушно-десантной мобильной бригаде.

Диагнозы устанавливались на основании общепринятых эпидемиологических, клинических и лабораторных критериев.

Пробы мокроты были получены при фибробронхоскопии, проводимой пациентам с бронхолегочной патологией в процессе планового обследования. Из 163 пациентов, включенных в исследование, у 124 была диагностирована пневмония, у 45 – ХОБЛ, у 23 – рак легких, у 6 был выявлен саркоидоз, у 3 – ТЭЛА. У 36 пациентов была выявлена комбинированная патология.

Пробы спинномозговой жидкости (ликвора) забирались при проведении диагностических люмбальных пункций пациентам с серозными (65) и гнойными (40) менингитами и менингоэнцефалитами. Кроме того, были изучены 53 пробы ликвора пациентов без нейроинфекций и 24 пробы ликвора пациентов с субарахноидальными кровоизлияниями.

Бактериальные суспензии приготавливались из свежих (суточной инкубации) чистых культур энтеробактерий и золотистых стафилококков. Выделение и идентификацию микроорганизмов выполняли в соответствии с общепринятыми рекомендациями с использованием культурального и серологического методов [И.В. Голубева, 1985]. Всего был собран и изучен 131 клинический изолят, в том числе 45 изолятов *E. coli*, 29 изолятов *C. frondi*, 21 изолят *S. aureus*, 10 изолятов *P. vulgaris*, 6 изолятов *P. mirabilis*, 5 изолятов *S. enteritidis*, по 4 изолята *E. cloacae* и *K. pneumoniae*, по 2 изолята *S. london* и *S. virchow*, и по 1 изоляту *P. morganii*, *P. aeruginosa* и *S. typhimurium*.

У всех изолятов микроорганизмов была определена устойчивость к ампициллину, цефотаксиму и амоксициллин/клавуланату с использованием диско-диффузионного метода [NCCLS Document M100-S9, 1999].

Для исследования был выделен 51 препарат поликлональных IgG субклассов 1, 2 и 4. Материалом для выделения послужила сыворотка крови 23 пациентов с рожей, 21 пациента с острым гнойным тонзиллитом и 7 пациентов с пневмонией. Использовалась комбинированная методика очистки, ранее разработанная нами специально для изучения абзимной активности поликлональных иммуноглобулинов [М.Р. Конорев, 1993]. В основе метода очистки лежит аффинная хроматография с использованием в качестве сорбента микрогранул агарозы, конъюгированных с протейном А золотистого стафилококка.

Для экспериментов были использованы очищенные препараты ЧСА двух типов: 1) полученный в лаборатории Витебской областной станции переливания крови спиртовой седиментацией по Кону; 2) особо высокой очистки пр-ва Sigma, исходно не содержащий глобулинов (Albumin from human serum lyophilized powder, Essentially globulin free, ~99%, A8763).

Для определения и количественной оценки бета-лактамазной активности биологических субстратов была использована методика, основанная на изменении окраски синтетического антибиотика цефалоспоринового ряда нитроцефина (3-(2,4-динитростирил)-(6R,7R)-7-(2-тиенилацетамидо)-цеф-3-ен-4-карбоновая кислота) при распаде его бета-лактамной связи. Максимум поглощения образовавшегося продукта реакции меняется с 390 нм на 486 нм, что делает возможной спектрофотометрическую детекцию бета-лактамазной активности.

Для исследования взаимодействия антибиотиков бета-лактамного ряда с нативной сывороткой крови и человеческим сывороточным альбумином использовали высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ). Для выполнения ВЭЖХ-анализа применялся комплекс HPLC System Agilent 1100 Series с установленной хроматографической колонкой Zorbax Eclipse XDB-C18 150×4,6 мм, размер частиц сорбента – 5 мкм.

Фракционирование сыворотки крови производилось при помощи препаративного диск-электрофореза в 7,5% полиакриламидном геле (ПААГ). По завершении электрофореза часть столбиков геля окрашивалась Кумасси R250, остальные разрезались на равные фрагменты длиной 0,5 см. Данные фрагменты помещались в пробирки Эппендорфа, после чего в каждую из пробирок добавлялся стандартный рабочий раствор нитроцефина с последующей спектрофотометрической регистрацией уровня бета-лактамазной активности.

По итогам оценки бета-лактамазной активности в отдельных фрагментах геля вычерчивался график распределения активности по длине столбика геля, который совмещался с фотографией аналогичного столбика, окрашенного Кумасси R250. Взаимное расположение протеиновых полос в окрашенном геле, их молекулярный вес и соответствие известным фракциям белков сыворотки крови документировались путем построения денситограмм и калибровочной кривой при помощи программы TotalLab TL120.

С целью оценки зависимости проявления бета-лактамазной активности сыворотки крови от сохранности трехмерной структуры ЧСА и наличия кофакторов (ионов Cu^{2+} и Zn^{2+}) исследуемые образцы сыворотки крови обрабатывались 2% раствором додецилсульфата натрия (ДДС), водным раствором мочевины с концентрацией 1, 5 и 10 мг/мл, а также 0,3 М раствором ЭДТА. Бета-лактамазная активность сыворотки крови, обработанной ДДС, ЭДТА и мочевиной, определялась при помощи нитроцефиновой методики по принятой схеме.

Выраженность конформационных изменений белков сыворотки крови после обработки детергентами и комплексообразователями оценивалась при помощи вертикального электрофореза в плоском 7,5% ПААГ в недиссоциирующих условиях. По завершении электрофореза часть пластин геля окрашивалась Ку-масси R250, часть – коллоидным серебром. Наличие и выраженность конформационных изменений белков сыворотки крови документировались путем сравнительного анализа денситограмм при помощи программы TotalLab TL120.

Для выявления зависимости бета-лактамазной активности сыворотки крови и ЧСА от pH микроокружения была использована нитроцефиновая методика, причем рабочий раствор нитроцефина был приготовлен с использованием различных буферных растворов в интервале pH от 2,5 до 13,0 с шагом 0,5.

Для оценки зависимости бета-лактамазной активности сыворотки крови и ЧСА от температуры среды пробы сыворотки крови либо ЧСА стандартного состава раздельно инкубировались при 33°C, 36°C, 39°C и 42°C.

Для оценки влияния ионной силы раствора на бета-лактамазную активность сыворотки крови и ЧСА был приготовлен рабочий раствор нитроцефина на фосфатном буферном растворе различной молярности, соответствующей ионной силе от 1,05 до 0,0082 моль/л.

Для оценки вклада глобулиновых белковых фракций в суммарную бета-лактамазную активность сыворотки крови образцы сывороток, проявивших наиболее высокую собственную активность, были обработаны взвесью гранул голубой сефарозы (Blue Sepharose CL-6B пр-ва Sigma), способной избирательно связывать альбумин (1 мл взвеси гранул связывает до 11,5 мг альбумина), в заведомо избыточном количестве, с последующим центрифугированием и определением бета-лактамазной активности надосадка.

Анализ и сравнение аминокислотных последовательностей различных белков производились при помощи программ CLC Main Workbench 5.6 и Unipro UGENE v1.6.0. Информация об аминокислотных последовательностях белков извлекалась из онлайн-баз данных, в частности, из базы NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) и Target 1 ProteinSequence (<http://www.drugbank.ca>).

Компьютерное моделирование («докинг») взаимодействия молекулы ЧСА с антибиотиками бета-лактаминового ряда, а также ингибиторами бета-лактамаз класса А производилось при помощи программ Vega ZZ 2.3.2.38, MGL Tools 1.5.4 и AutoDock Vina 1.1.2. Визуализация результатов докинга и реконструкция механизма катализа производилась программой Accelrys Discovery Studio Client 2.5. Трехмерные модели молекул антибиотиков и ингибиторов бета-лактамаз были найдены в базе PubChem Substance (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pcsubstance>). Там же была найдена использованная в исследовании трехмерная модель молекулы альбумина с разрешением 1,9 Å [M. Wardell, 2002].

Для проверки рассчитанных моделей взаимодействия ЧСА и бета-лактамовых антибиотиков была использована информация об аминокислотном составе участков связывания различных веществ на поверхности молекулы ЧСА, полученная из международного патента WO 2005/041895. В частности, были выполнены опыты по ингибированию бета-лактамазной активности ЧСА и нативной сыворотки крови растворами клавулановой кислоты и тазобактама (в различных концентрациях), а также фуросемида и ацетилсалициловой кислоты.

Статистический анализ результатов исследования производился при помощи аналитических пакетов Statistica 8.0, SPSS 19 и MedCalc 10.2 (ROC-анализ), а также GraphPad Prism 5.0 (сравнение скоростей распада бета-лактамовых антибиотиков, документированных графически при помощи ВЭЖХ).

В процессе выполнения исследования была разработана тест-система «БиоЛактам», предназначенная для выявления и количественной оценки бета-лактамазной активности в биологических субстратах. Условия для промышленного производства указанной тест-системы оговорены в ТУ BY 391353648.001–2011, утвержденных УП «Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении» Республики Беларусь решением от 6 июля 2011 г.

Клиническое значение бета-лактамазной активности сыворотки крови

Сыворотка крови всех обследованных лиц характеризуется наличием определенного уровня бета-лактамазной активности; средний уровень указанной активности составляет 61,2% распада внесенного в пробу стандартного количества нитроцефина (95% ДИ: 60,3...62,1), причем значения данного признака изменяются в диапазоне от 0 до 99,2% (см. таблицу 1).

Имеет место последовательное снижение уровня бета-лактамазной активности сыворотки крови в следующем порядке: практически здоровые военнослужащие > пациенты с туберкулезом легких > пациенты с вирусными менингитами > пациенты с аденовирусной инфекцией > пациенты с острым гнойным тонзиллитом > пациенты с травматологической патологией > пациенты с бактериальными пневмониями > пациенты с эпидемическим гриппом А (H1N1) > пациенты с рожей > пациенты с бактериальными менингитами.

Бета-лактамазная активность сыворотки крови определенно не является ответом организма на воздействие антибактериальной терапии. Соответственно, антибиотики бета-лактамового ряда не являются непосредственными индукторами бета-лактамазной активности крови человека.

Применение факторного анализа выявило в анализируемой выборке подгруппу пациентов с тяжелым течением патологического процесса, значительной продолжительностью антибактериальной терапии, частой сменой антибио-

тивов, нередко назначением антибактериальных препаратов резерва всех групп и различными уровнями бета-лактамазной активности. Можно предположить, что высокий уровень бета-лактамазной активности крови у данных пациентов будет препятствовать успешному лечению, снижая эффективность назначенных им антибиотиков из группы бета-лактамов.

Таблица 1 – Показатели среднего уровня и разброса значений бета-лактамазной активности сыворотки крови в группах пациентов и здоровых лиц, входящих в состав исследуемой выборки

Группа	n	M	95% ДИ	min	max	25%	Me	75%
1	53	52,3	49,2...55,5	20,9	71,7	46,4	54,9	61,2
2	62	55,8	52,8...58,7	0,0	66,6	55,5	59,6	61,3
3	51	62,9	61,5...64,2	53,1	71,5	59,5	62,8	66,1
4	10	63,1	60,0...66,3	57,1	69,9	58,6	64,4	65,2
5	9	50,8	38,5...63,1	19,6	66,6	38,3	57,3	63,1
6	78	61,1	59,6...62,6	43,7	96,7	57,6	61,2	64,3
7	32	54,3	50,2...58,3	26,7	70,9	49,1	56,7	62,3
8	60	60,4	59,0...61,8	45,2	70,0	56,4	60,1	64,5
9	63	66,0	64,2...67,8	42,7	99,2	63,5	65,6	68,6
10	82	70,5	68,8...72,3	40,4	90,1	67,1	71,9	75,5
Всего	500	61,2	60,3...62,1	0,0	99,2	57,1	62,1	66,9

Примечания – 1) 1 – группа пациентов с рожистым воспалением, 2 – бактериальными пневмониями, 3 – аденовирусной инфекцией, 4 – вирусными менингитами, 5 – бактериальными менингитами, 6 – острым гнойным тонзиллитом, 7 – эпидемическим гриппом А (H1N1), 8 – различной травматологической патологией, 9 – туберкулезом легких, 10 – практически здоровые военнослужащие; 2) M – среднее арифметическое, Me – медиана.

В подгруппе пациентов с высокой ($\geq 68,2\%$) бета-лактамазной активностью сыворотки крови замена бета-лактамных антибиотиков на препараты из других фармакологических классов (или ингибитор-защищенные бета-лактамы) приводит к существенному (на 4,6 суток), статистически значимому ($p=0,003$) сокращению продолжительности госпитализации по сравнению с подгруппой пациентов с низкой сывороточной бета-лактамазной активностью.

Приблизительно треть (39,2%) образцов высокоочищенных поликлональных IgG, выделенных из сыворотки крови пациентов с инфекционной патологией, обладает собственной незначительной бета-лактамазной активностью. Данная активность соотносится с общей сывороточной как 1 : 10,4, причем удельная активность препаратов поликлональных IgG в 1,5...8 раз ниже, чем активность цельной сыворотки крови с аналогичной концентрацией белка. Со-

ответственно, общая высокая бета-лактамазная активность сыворотки крови определенно обусловлена не только ее гамма-глобулиновой фракцией.

При тяжелом течении инфекционных заболеваний происходит перераспределение роли факторов, опосредующих сывороточную бета-лактамазную активность, причем относительный вклад фракции поликлональных IgG в данный феномен при этом растет.

Природа бета-лактамазной активности сыворотки человеческой крови

Максимальный уровень распада нитроцефина (т.е. максимальная выраженность бета-лактамазной активности) приходится на альбуминовую фракцию сыворотки крови. Очищенные препараты ЧСА различного происхождения в концентрации, близкой к сывороточной, обладают собственной бета-лактамазной активностью, сравнимой с таковой у цельной сыворотки крови.

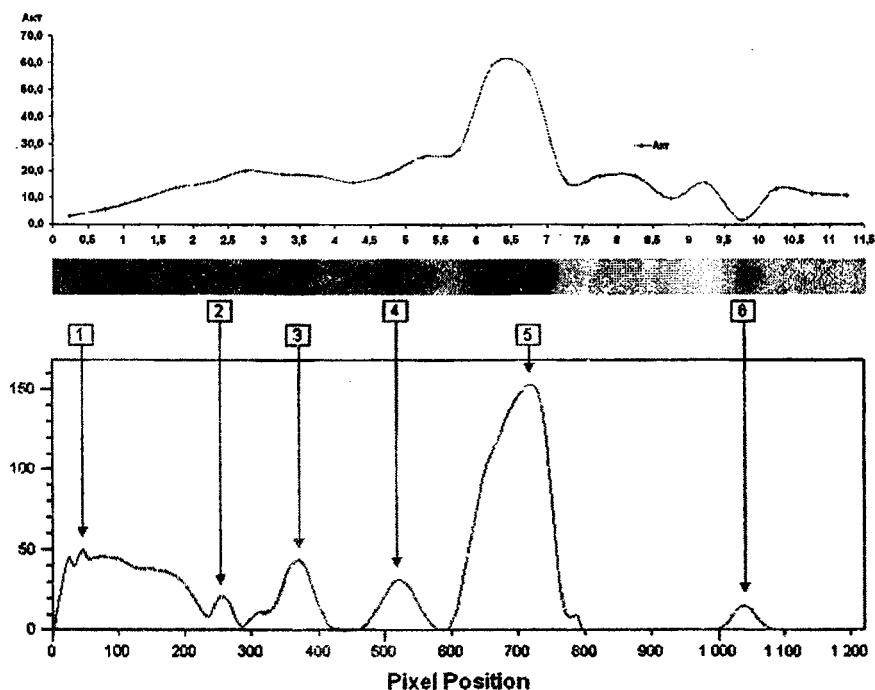
Большинство белковых фракций крови, помимо ЧСА, обладает собственной незначительной бета-лактамазной активностью. Данная активность составляет в среднем 9,6% от общей сывороточной (см. рисунок 1).

Активность 1 М ЧСА превышает таковую 1 М поликлональных IgG в среднем в 3,8 раза. Соответственно, поликлональные IgG с абзимными свойствами вносят свой вклад в общую сывороточную бета-лактамазную активность, но в целом данный вклад невелик и в значительном большинстве случаев определенно не превышает 10-15%. Тем не менее, при тяжелом течении инфекционных заболеваний относительный вклад поликлональных IgG в описываемый феномен растет, а ЧСА – падает, поскольку тяжелое течение инфекционных (и не только) заболеваний обычно сопровождается ацидозом, при котором резко снижается бета-лактамазная активность сывороточного альбумина.

Бета-лактамы антибиотиков, не разрушающиеся под воздействием ЧСА, не разрушаются и цельной сывороткой крови. По отношению к бета-лактамам антибиотикам, разрушаемым ЧСА, нативная сыворотка крови в некоторых случаях может проявлять существенно более высокую (до +32,5%) собственную бета-лактамазную активность, чем очищенные препараты сывороточного альбумина любого происхождения в нормальной для человеческой крови концентрации. Данная разница в активности определенно обусловлена свойствами глобулиновых белковых фракций сыворотки крови.

Бета-лактамазная активность ЧСА повышается пропорционально увеличению его концентрации (вплоть до 15-20 г/л), затем рост активности замедляется, а при содержании ЧСА в пробе около 30 г/л – стабилизируется; дальнейший рост концентрации ЧСА не приводит к повышению активности. Таким образом, у большинства обследованных лиц уровень бета-лактамазной активно-

сти крови потенциально максимален, и наблюдаемые различия могут быть обусловлены только воздействием различных модифицирующих факторов, что подтверждается также отсутствием корреляционной связи между концентрацией альбумина в образцах сыворотки крови и бета-лактамазной активностью данных образцов ($n=101$, $r=0,297$). Измерение концентрации ЧСА в образцах сыворотки крови было выполнено в клинической лаборатории УЗ ВОКИБ при помощи автоматического биохимического анализатора Eurolyser CCA 180.



Примечания – 1) По оси абсцисс отложены сантиметры (отсчет с линии старта электрофореза), по оси ординат – % распавшегося нитроцефина от его первоначально внесенного количества; 2) Денситограмма соответствует расположению окрашенных полос в столбике геля: 1 – γ -глобулины, 2-3 – β -глобулины, 4 – α -глобулины, 5 – альбумин, 6 – преальбумины.

Рисунок 1 – Распределение бета-лактамазной активности по длине столбика геля после препаративного диск-электрофореза сыворотки крови

Оптимум pH для реакции распада нитроцефина под воздействием ЧСА лежит в районе 9,0. При этом имеет место резкое увеличение уровня бета-лактамазной активности ЧСА при повышении pH с 7,0 до 8,0. Таким образом, при

различных патологических состояниях бета-лактамазная активность человеческой крови может скачкообразно изменяться — снижаться до минимальных цифр при ацидозе любого генеза (типичном для большинства тяжелых заболеваний и неотложных состояний) и резко нарастать при алкалозе (также встречающемся при некоторых тяжелых заболеваниях и неотложных состояниях).

Бета-лактамазная активность человеческой крови быстро возрастает с повышением температуры тела, и у пациентов с фебрильной или гиперпиретической лихорадкой *in vivo* она может оказаться существенно (до +44,6%) выше, чем у здоровых лиц или невысоко лихорадящих пациентов.

С повышением ионной силы раствора уровень бета-лактамазной активности ЧСА снижается, причем естественная ионная сила человеческой крови ($\approx 0,15$ моль/л) соответствует практически максимальной выраженности бета-лактамазной активности ЧСА.

Кинетика реакции распада нитроцефина под воздействием ЧСА типична для ферментативных реакций первого порядка. Константа Михаэлиса-Ментен (K_m) для данной реакции равна 0,115, т.е. концентрация нитроцефина, при которой скорость его распада, катализируемого сывороточным альбумином, равна половине максимальной, составляет 0,115 мг/мл.

Кофакторы, в частности, ионы Zn (II) и Cu (II), не могут опосредовать более 8,1% от уровня собственной бета-лактамазной активности ЧСА; при этом для проявления указанной активности важна пространственная (т.е. третичная) структура альбумина — при ее денатурации под воздействием додецилсульфата натрия бета-лактамазная активность ЧСА падает практически до нуля, чего не наблюдается при его обработке более мягким детергентом (мочевинной).

Клавулановая кислота и, в меньшей степени, тазобактам способны существенно снижать бета-лактамазную активность сыворотки крови, вероятно, вследствие ее конкурентного ингибирования, что подразумевает наличие в молекуле ЧСА некоего «активного центра», отличающегося (по аминокислотному составу и пространственной организации) от такового у бактериальных бета-лактамаз класса А. МПК₅₀ клавуланата калия составляет 1,97 мг/мл.

ВЭЖХ-анализ подтверждает, что в процессе взаимодействия бензилпенициллина и сывороточного альбумина происходит образование комплексов «ЧСА—бензилпенициллин» двух типов, а затем — полная диссоциация указанных комплексов к исходу первого часа инкубации при 37°C, сопровождающаяся разрушением бензилпенициллина и образованием продуктов его распада. Кроме того, было строго доказано, что при взаимодействии сывороточного альбумина и бензилпенициллина происходит гидролиз последнего по бета-лактамной связи, как и при воздействии бактериальных пенициллиназ.

Компьютерное моделирование взаимодействия ЧСА с молекулами различных бета-лактамных антибиотиков и конкурентных ингибиторов бета-лактамаз выявило в составе молекулы альбумина активный центр, образованный боковыми радикалами аминокислот TYR 148, TYR 150, LYS 195, GLN 196, LYS 199, CYS 200, ARG 218, ARG 222, VAL 241, HIS 242, CYS 245, ARG 257, ALA 291 и ASP 451. Данный активный центр отвечает за связывание с альбумином всех изученных нами бета-лактамных антибиотиков и клавулановой кислоты (см. рисунок 2). Сульбактам и тазобактам связываются с молекулой ЧСА в другом участке, образованном аминокислотами PRO 384, LEU 387, ILE 388, ASN 391, GLY 434, ALA 449 и ARG 485, что объясняет вдвое меньшую эффективность ингибирования бета-лактамазной активности сыворотки крови тазобактамом по сравнению с клавуланатом калия аналогичной концентрации.

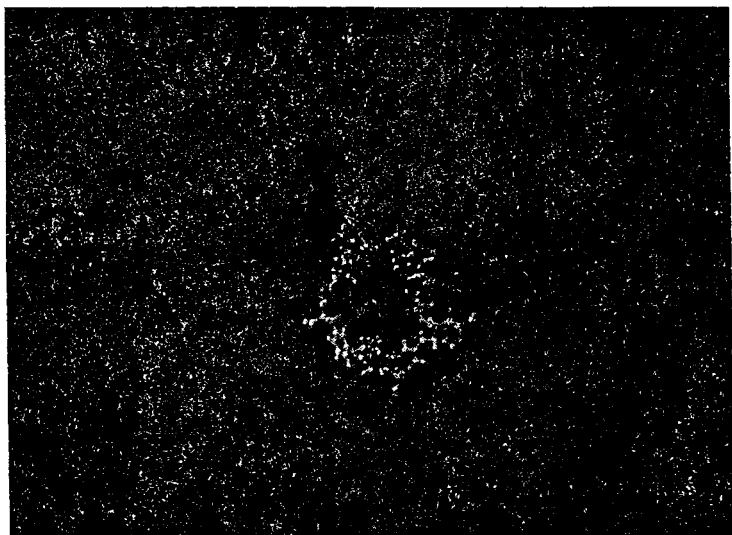


Рисунок 2 – Активный центр ЧСА, связывающий бета-лактамы

Реконструированный механизм катализа существенно отличается от такового у сериновых бета-лактамаз класса А. Наиболее вероятно, что в процессе катализируемого альбумином гидролиза бета-лактамной связи участвуют боковые радикалы ASP 451 и ARG 222, причем ASP 451 выступает в роли донора электронов, а ARG 222 – акцептора. Также нельзя исключить, что бета-лактамазная активность ЧСА обусловлена взаимодействием SER 192 с бета-лактамной связью при посредстве LYS 195 и GLU 153, причем боковой радикал серина является донором электронов, а лизина – акцептором.

Распад по меньшей мере 4 антибиотиков бета-лактамной группы (бензилпенициллина, цефалексина, азтреонама и имипенема) статистически значимо ускоряется под воздействием ЧСА по сравнению со спонтанным распадом в контрольных пробах. Согласно экспериментальным данным, к шестому часу с момента парентерального введения перечисленных антибиотиков в организм человека их взаимодействие с ЧСА должно привести к гидролизу дополнительных (плюс к уровню самораспада) 2,3% азтреонама, 7,5% бензилпенициллина, 10,8% цефалексина и 11,9% имипенема. Таким образом, собственная бета-лактамазная активность альбумина может обуславливать распад значимых количеств бета-лактамных препаратов, реально применяемых в клинической практике, тем самым снижая их клиническую эффективность. При этом вид кинетических кривых распада бензилпенициллина, цефалексина и имипенема под воздействием ЧСА характерен для ферментативных реакций 1-го порядка, а в случае с азтреонамом – нулевого порядка. Следует особо отметить, что ЧСА оказался способен разрушать антибиотики, традиционно используемые как препараты дальнего резерва у пациентов с тяжелым течением бактериальных инфекций – имипенем и азтреонам; указанные антибиотики считаются устойчивыми к воздействию большинства бактериальных бета-лактамаз.

Повышение температуры с 37°C до 39°C приводит к ускорению катализируемого альбумином распада имипенема в среднем на 14,0% (до 33,3% к 6 часу инкубации), а цефалексина – в среднем на 15,7%. Таким образом, у лихорадящих пациентов с температурой тела 39°C и выше распад бета-лактамных антибиотиков под воздействием ЧСА существенно ускоряется, что должно приводить к дополнительному снижению их клинической эффективности. Таким образом, у пациентов с высокой (39°C и выше) лихорадкой, чья сыворотка крови обладает выраженной бета-лактамазной активностью (60% и более), используемые дозировки бензилпенициллина, цефалексина и имипенема необходимо увеличивать минимум на 25%, либо использовать для проведения антибактериальной терапии таким пациентам ингибитор-защищенные препараты бета-лактамов, желательно – содержащие клавулановую кислоту, а не тазобактам либо сульбактам (например, амоксициллин/ клавуланат).

Биологическая резистентность к бета-лактамным антибиотикам при респираторных инфекциях

У всех пациентов с респираторными инфекциями был выявлен тот или иной ненулевой уровень бета-лактамазной активности сыворотки крови. Показатели центральной тенденции и дисперсии уровней указанной активности приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Показатели среднего уровня и разброса значений бета-лактамазной активности сыворотки крови пациентов с респираторными инфекциями

Группа	n	M	95% ДИ	min	max	25%	Me	75%
1	62	55,8	52,8...58,7	0,0	66,6	55,5	59,6	61,3
2	51	62,9	61,5...64,2	53,1	71,5	59,5	62,8	66,1
3	32	54,3	50,2...58,3	26,7	70,9	49,1	56,7	62,3
4	63	66,0	64,2...67,8	42,7	99,2	63,5	65,6	68,6

Примечания – 1) 1 – группа пациентов с бактериальными пневмониями, 2 – аденовирусной инфекцией, 3 – эпидемическим гриппом А (H1N1), 4 – туберкулезом легких; 2) M – среднее арифметическое, Me – медиана.

Во всех сравниваемых группах пациентов (кроме лиц с туберкулезом легких) уровень сывороточной бета-лактамазной активности был обратно пропорционален тяжести течения заболевания. Особенно отчетливо это прослеживается в группе пациентов с эпидемическим гриппом А (H1N1). При этом уровень сывороточной бета-лактамазной активности оказался обратно пропорционален возрасту пациентов с пневмонией.

Наивысший уровень бета-лактамазной активности отмечается в группе пациентов с туберкулезом легких; кроме того, у данных пациентов отсутствует зависимость уровня активности от возраста и тяжести течения заболевания. Таким образом, группа пациентов с туберкулезом стоит особняком от других изученных нами групп пациентов с респираторной патологией.

Показано, что уровень сывороточной бета-лактамазной активности прямо пропорционален концентрации альбумина в крови пациентов.

Согласно данным факторного анализа, в группе пациентов с бактериальными пневмониями существует подгруппа, составляющая до 31% от выборки, где различные индивидуальные уровни сывороточной бета-лактамазной активности соответствуют тяжелому течению заболевания, значительной продолжительности госпитализации, высокой лихорадке, частой смене антибактериальной терапии, а также нередкому назначению антибиотиков резерва как бета-лактаманного ряда, так и из других фармакологических групп. Можно предположить, что высокий уровень бета-лактамазной активности крови у таких пациентов будет препятствовать успешной этиотропной терапии пневмоний, снижая эффективность назначенных им антибиотиков бета-лактаманного ряда.

До 89,0% (95% ДИ: 84,2...93,8) исследованных проб мокроты пациентов с заболеваниями респираторного тракта обладают собственной бета-лактамазной активностью, равной или превышающей 1%. Частотное распределение уровней бета-лактамазной активности изученных проб мокроты см. на рисунке 3.

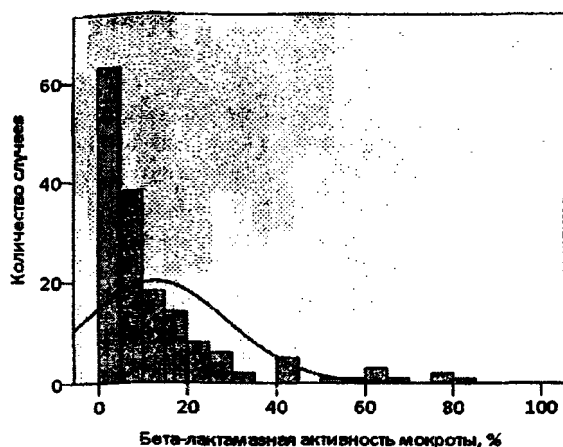


Рисунок 3 — Частотное распределение бета-лактамазной активности изученных образцов мокроты

Показано, что в некоторых образцах мокроты ЧСА вносит определенный вклад в суммарный уровень бета-лактамазной активности.

Относительно высокая (более 20%) бета-лактамазная активность мокроты достоверно увеличивает вероятность неудачи стартовой эмпирической антибактериальной терапии в 2,0-3,1 раза (см. таблицу 3).

В случае выявления подобного феномена у пациента состав проводимой ему антибактериальной терапии должен учитывать возможное снижение эффективности бета-лактамов: следует назначать либо антибиотики, высокоустойчивые к бета-лактамазам бактерий (карбапенемы, монобактамы, цефалоспорины 4-го поколения, ингибитор-защищенные бета-лактамы), либо препараты из других фармакологических групп (макролиды, гликопептиды, оксазолидиноны, фторхинолоны, аминогликозиды, линкозамиды и т.п.).

Таблица 3 — Отношения рисков для показателей, характеризующих эффективность антибактериальной терапии у пациентов с респираторными инфекциями

Показатель	Risk Ratio	95% ДИ
3 и более смены антибактериальной терапии	3,07	1,45...6,51
Факт назначения антибиотиков резерва	2,03	1,12...3,68
Факт назначения антибиотиков резерва из группы бета-лактамов	2,36	1,10...5,06
Всего назначено 5 и более антибиотиков	2,22	1,11...4,44

Биологическая резистентность к бета-лактамам антибиотикам при нейроинфекциях

У всех пациентов с серозными и гнойными менингитами был выявлен тот или иной ненулевой уровень собственной бета-лактамазной активности сыворотки крови. Показатели центральной тенденции и разброса данных указанной активности приведены в таблице 4.

Таблица 4 – Показатели среднего уровня и разброса значений бета-лактамазной активности сыворотки крови пациентов с нейроинфекциями

Группа	n	M	95% ДИ	min	max	25%	Me	75%
1	10	63,1	60,0...66,3	57,1	69,9	58,6	64,4	65,2
2	9	50,8	38,5...63,1	19,6	66,6	38,3	57,3	63,1

Примечания – 1) 1 – группа пациентов с вирусными менингитами, 2 – группа пациентов с бактериальными менингитами; 2) M – среднее арифметическое, Me – медиана.

Наибольший уровень сывороточной бета-лактамазной активности отмечается в группе пациентов с вирусными менингитами, уровень бета-лактамазной активности крови в группе пациентов с бактериальными менингитами значительно ниже, причем данная разница статистически значима.

Уровень сывороточной бета-лактамазной активности обратно пропорционален возрасту пациентов, включенных в исследование.

В обеих группах пациентов уровень сывороточной бета-лактамазной активности обратно пропорционален тяжести течения заболевания.

До 97,6% (95% ДИ: 95,5...99,7) исследованных образцов СМЖ пациентов с нейроинфекциями обладают собственной бета-лактамазной активностью, равной или превышающей 1%. Частотное распределение уровней выявленной бета-лактамазной активности проб СМЖ см. на рисунке 4.

Бета-лактамазная активность большинства изученных проб СМЖ опосредована в первую очередь примесями ЧСА; тем не менее, высокая бета-лактамазная активность, регистрируемая в некоторых образцах ликвора, определено не обусловлена сывороточным альбумином.

Наивысший уровень бета-лактамазной активности СМЖ отмечается у пациентов с субарахноидальными кровоизлияниями, что позволяет использовать оценку бета-лактамазной активности СМЖ как дополнительный диагностический тест для выявления данной патологии.

Приблизительно 10% пациентов с бактериальными менингитами характеризуется высокой (более 40%) бета-лактамазной активностью СМЖ, которая, вероятно, связана с гиперпродукцией бета-лактамаз микроорганизмами – возбудителями данных заболеваний.

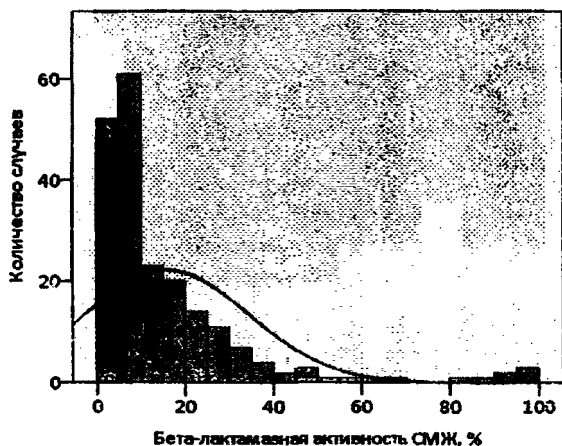


Рисунок 4 – Частотное распределение бета-лактамазной активности изученных образцов СМЖ

Согласно данным факторного анализа, в группе пациентов с нейроинфекциями существует подгруппа, составляющая до 51,6% от выборки, где различные индивидуальные уровни сывороточной бета-лактамазной активности соответствуют тяжелому течению заболевания, значительной продолжительности антибактериальной терапии и большому количеству антибактериальных препаратов, используемых одновременно, а также нередкому назначению антибиотиков резерва как бета-лактаманного ряда, так и из других фармакологических групп. Можно предположить, что высокий уровень бета-лактамазной активности сыворотки крови у таких пациентов будет препятствовать успешной этиотропной терапии бактериальных менингитов, снижая эффективность назначенных им антибиотиков бета-лактаманного ряда.

Относительно высокая (более 20%) бета-лактамазная активность ликвора достоверно увеличивает вероятность неудачи стартовой эмпирической антибактериальной терапии, проводимой пациентам с бактериальными поражениями ЦНС, в 1,8-2,3 раза (см. таблицу 5).

В случае выявления подобного феномена у конкретного пациента состав проводимой ему антибактериальной терапии должен учитывать возможное снижение эффективности бета-лактаманых препаратов: следует назначать либо антибиотики, высокоустойчивые к бета-лактамазам бактерий (карбапенемы, монобактамы, цефалоспорины 4-го поколения), либо препараты из других фармакологических групп (гликопептиды, оксазолидиноны, фторхинолоны, ами-

ногликозиды, рифамицины, хлорамфеникол и т.п.). Эффективными могут также оказаться ингибитор-защищенные бета-лактамы.

Таблица 5 – Отношения рисков для показателей, характеризующих эффективность антибактериальной терапии у пациентов с нейроинфекциями

Показатель	Risk Ratio	95% ДИ
2 и более смены антибактериальной терапии	1,94	1,01...3,72
Назначение антибиотиков резерва из группы бета-лактамов	2,31	1,22...4,40
Назначение антибиотиков первой линии, не относящихся к группе бета-лактамов	2,12	1,38...3,27
Назначение антибиотиков резерва не относящихся к группе бета-лактамов	1,89	1,09...3,29
За время лечения суммарно назначено 3 и более антибиотика	1,86	1,16...2,98
За время лечения суммарно назначено 4 и более антибиотика	2,33	1,28...4,25
За время лечения суммарно назначено 5 и более антибиотиков	3,24	1,39...7,58
За время лечения суммарно назначено 6 и более антибиотиков	5,89	1,68...20,65

Оценка бета-лактамазной активности бактериальной взвеси с использованием тест-системы «БиоЛактам»

Тест-система «БиоЛактам» может успешно использоваться для качественной и количественной оценки бета-лактамазной активности бактериальных суспензий. Получаемые при этом результаты хорошо согласуются с данными параллельных исследований с применением диско-диффузионного метода (R Спирмена до 0,683 при $p < 0,0001$ и $n = 130$).

При помощи тест-системы «БиоЛактам» можно с высокой степенью достоверности определить:

- факт продукции клинически значимых количеств бета-лактамаз клиническими изолятами бактерий (активность $\geq 14,2\%$). При сравнении с диско-диффузионным методом в качестве референсного чувствительность данной методики составляет 76,4% (95% ДИ: 64,9...85,6), специфичность – 82,8% (95% ДИ: 70,6...91,4) при $p < 0,0001$;

- факт устойчивости клинических изолятов бактерий к ингибитор-защищенным антибиотикам бета-лактаманного ряда (активность $\geq 26,5\%$). При сравнении с диско-диффузионным методом в качестве референсного чувствитель-

ность данной методики составляет 79,2% (95% ДИ: 65,0...89,5), специфичность – 79,3% (95% ДИ: 68,9...87,4) при $p < 0,0001$;

– факт устойчивости клинических изолятов бактерий к цефалоспорином третьего поколения (активность $\geq 81,2\%$). При сравнении с диско-диффузионным методом в качестве референсного чувствительность данного варианта методики составляет 82,4% (95% ДИ: 56,6...96,0), специфичность – 94,7% (95% ДИ: 88,8...98,8) при $p < 0,0001$

– при совместном использовании с диско-диффузионным методом бактериологического анализа – также факт наличия неферментативных механизмов устойчивости к антибиотикам бета-лактаминового ряда у клинических изолятов возбудителей инфекционных заболеваний.

Тест-система «БиоЛактам» оптимальна для определения уровня устойчивости энтеробактерий к бета-лактамам антибиотикам, поскольку эта устойчивость опосредуется почти исключительно продукцией бета-лактамаз. Соответственно, тест-система ограничено применима для определения уровня устойчивости к бета-лактамам грам(+) кокков, поскольку устойчивость данных бактерий к этим антибиотикам может обуславливаться как продукцией бета-лактамаз (ряд штаммов стафилококков), так и модификацией пенициллин-связывающих белков (все стрептококки, часть стафилококков). Кроме того, разработанная тест-система не позволяет напрямую дифференцировать обычные бета-лактамазы от БЛРС, поскольку у те, и другие разрушают нитроцефин.

Экономическая эффективность практического использования тест-системы «БиоЛактам»

Оценка эффективности затрат на дополнительные исследования проводилась согласно клиническим протоколам диагностики и лечения инфекционных болезней (приказ МЗ РБ №484 от 13.06.2006 г.). Базовые данные для расчета усредненной стоимости нахождения в стационаре одного пациента с бактериальной инфекцией получены в экономическом отделе УЗ «Витебская областная клиническая инфекционная больница» на основании инструкции о порядке исчисления себестоимости медицинской помощи и других услуг, оказываемых организациями здравоохранения, финансируемыми из бюджета (постановление МЗ РБ №13 от 01.04.2004 г.). Данные о стоимости обследования с использованием тест-системы «БиоЛактам» установлены в соответствии со сведениями об отпускной цене на данный продукт, предоставленными ООО «Научно-производственное предприятие «Витаген».

За 2010 г. в УЗ ВОКИБ было зарегистрировано 805 случаев учитываемых в данном исследовании бактериальных инфекций (242 случая бактериальных пневмоний, 407 случаев острых гнойных тонзиллитов, 15 случаев гнойных ме-

нингитов / менингоэнцефалитов и 141 случай рожистого воспаления). Экстраполируя полученные в изученной нами выборке данные на генеральную совокупность, следует ожидать, что высокая (более 68,2%) бета-лактамазная активность сыворотки крови будет наблюдаться у 80 пациентов, высокая (более 20%) бета-лактамазная активность СМЖ – у 4 пациентов с бактериально-воспалительными поражениями ЦНС, и высокая (более 20%) бета-лактамазная активность мокроты – у 45 пациентов с бактериальными пневмониями. Оценочный подсчет экономической эффективности от использования тест-системы «БиоЛактам» производился именно исходя из данных цифр.

Показано, что использование тест-системы «БиоЛактам» в клинических условиях является экономически эффективным.

Общая экономия от применения тест-системы «БиоЛактам» в расчете на 1000 пролеченных пациентов с бактериальными инфекциями и высокой бета-лактамазной активностью сыворотки крови составляет 235.300 у.е., что в перерасчете на реальное количество подобных пациентов (80), госпитализируемых в УЗ ВОКИБ за 1 год, дает 18.824 у.е. Коэффициент экономической эффективности при этом составит 42,8.

Общая экономия от применения тест-системы «БиоЛактам» в расчете на 1000 пролеченных пациентов с бактериально-воспалительными поражениями ЦНС и высокой бета-лактамазной активностью СМЖ составляет 295.500 у.е., что в перерасчете на реальное количество подобных пациентов, госпитализируемых в УЗ ВОКИБ за 1 год (4), дает 1.182 у.е. Коэффициент экономической эффективности при этом составит 53,7.

Все вышеприведенные вычисления действительны для УЗ ВОКИБ; в масштабах Республики Беларусь количество учреждений здравоохранения аналогичной или большей мощности, осуществляющих госпитализацию и лечение пациентов подобного профиля, составляет около 150.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные научные результаты диссертации

В настоящей работе изучено явление собственной бета-лактамазной активности нативной сыворотки человеческой крови и ее клиническое значение при социально значимых инфекционных заболеваниях, раскрыт молекулярный механизм данного явления и его клиническое значение. Кроме того, произведена качественная и количественная оценка собственной бета-лактамазной активности других биологических жидкостей (мокроты и спинномозговой жидкости), а также бактериальных суспензий, и сделаны выводы о способах и перспективах клинического применения результатов данного анализа. Разработана тест-система «БиоЛактам» и получено разрешение на ее промышленное произ-

водство, регламентированное ТУ ВУ 391353648.001–2011 (утверждены УП «Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении» РБ решением от 6 июля 2011 г. Полученные нами результаты исследования, в соответствии с поставленными задачами, позволяют сделать следующие общие выводы:

1. У значительной части пациентов с социально значимыми инфекционными заболеваниями регистрируется высокий уровень бета-лактамазной активности сыворотки крови, оказывающий негативное влияние на эффективность проводимой им антибактериальной терапии с применением антибиотиков бета-лактамного ряда. Средний уровень указанной активности составляет 61,2% распада стандартного количества нитроцефина (95% ДИ: 60,3...62,1), значения данного признака изменяются в диапазоне от 0 до 99,2% [1, 4, 12, 13, 14, 16, 17, 26, 30, 34, 38, 39, 40, 42, 47];

2. Биологическая резистентность к бета-лактамным антибиотикам на 70–90% обусловлена свойствами человеческого сывороточного альбумина, на 10–30% – свойствами поликлональных IgG субклассов 1, 2 и 4. Бета-лактамазная активность ЧСА зависит от pH среды (оптимум при 9,0 с резким увеличением в интервале 7,0–8,0), ионной силы раствора (максимальная при уровне ионной силы, нормальном для человеческой крови), температуры тела (существенный рост при повышении до 39–40°C), что необходимо учитывать при применении бета-лактамных антибиотиков для лечения пациентов с социально значимыми бактериальными инфекциями, особенно сопровождающимися высокой лихорадкой и/или декомпенсированным алкалозом [1, 3, 7, 8, 9, 10, 18, 20, 22, 23, 24, 25, 29, 32, 41, 45, 46];

3. Бета-лактамазная активность ЧСА проявляется при условии сохранности его третичной структуры. В составе молекулы альбумина имеется активный центр, образованный боковыми радикалами аминокислот TYR 148, TYR 150, LYS 195, GLN 196, LYS 199, CYS 200, ARG 218, ARG 222, VAL 241, HIS 242, CYS 245, ARG 257, ALA 291 и ASP 451, отвечающий за связывание ЧСА с бета-лактамными антибиотиками и клавулановой кислотой. Сульбактам и тазобактам связываются с молекулой ЧСА в другом участке, образованном боковыми радикалами аминокислот PRO 384, LEU 387, ILE 388, ASN 391, GLY 434, ALA 449 и ARG 485. Клавулановая кислота и, в меньшей степени, тазобактам способны ингибировать бета-лактамазную активность сыворотки крови, что необходимо учитывать при применении ингибитор-защищенных бета-лактамных антибиотиков для лечения пациентов с социально значимыми инфекционными заболеваниями бактериальной природы [1, 15, 21, 25, 46];

4. Бета-лактамазная активность сыворотки крови проявляется в отношении всех классов бета-лактамных антибиотиков (пенициллинов, цефалоспоринов, карбапенемов, монобактамов), ее выраженность пропорциональна уровню

распада нитроцефина в соответствующих пробах. ЧСА способен разрушать антибиотики, используемые как препараты резерва у пациентов с тяжелым течением бактериальных инфекций – имипенем и азтреонам; при этом нативная сыворотка крови может проявлять существенно более высокую бета-лактамазную активность, чем очищенные препараты альбумина [1, 11, 24, 25];

5. Разработана тест-система «БиоЛактам», предназначенная для количественной оценки бета-лактамазной активности биологических субстратов (сыворотки крови, мокроты, спинномозговой жидкости) и бактериальных суспензий. Спектрофотометрическая методика, лежащая в основе тест-системы, отличается высокой чувствительностью и воспроизводимостью, а также быстротой выполнения (30-120 минут) и невысокой стоимостью одного определения. Применение тест-системы не требует использования дорогостоящего оборудования и предварительного выделения чистой культуры возбудителей заболевания [19, 27, 28, 33, 35, 36, 43, 44, 49];

6. Установлено, что бета-лактамазная активность мокроты $\geq 20\%$ значительно увеличивает вероятность неудачи эмпирической антибактериальной терапии пневмоний в 2,0-3,1 раза. При бета-лактамазной активности спинномозговой жидкости $\geq 20\%$ вероятность неудачи эмпирической этиотропной терапии бактериальных менингитов повышается в 1,9-3,2 раза. Выявление высокого уровня бета-лактамазной активности в вышеуказанных биологических субстратах с высокой степенью достоверности указывает на необходимость назначения пациентам с социально значимыми бактериальными инфекциями ЦНС и респираторного тракта ингибитор-защищенных бета-лактамов либо антибиотиков из других фармакологических групп с аналогичным спектром активности и фармакокинетикой [1, 2, 5, 6, 31, 37];

7. Предложен алгоритм назначения бета-лактамов антибиотиков для лечения пациентов с социально значимыми бактериальными инфекциями (рожа, острые гнойные тонзиллиты, пневмонии, другие заболевания респираторного тракта, бактериальные поражения ЦНС) в зависимости от уровня бета-лактамазной активности их сыворотки крови: при активности $\geq 68,2\%$ рекомендуется коррекция антибактериальной терапии – назначение ингибитор-защищенных бета-лактамов либо антибиотиков из других фармакологических групп со сходными спектром активности и фармакокинетикой. Данный алгоритм позволяет повысить эффективность этиотропной терапии и снизить финансовые затраты на лечение подобных пациентов за счет сокращения продолжительности их госпитализации в среднем на 4,6 суток [1, 12, 13, 14, 16, 17, 30, 34, 39, 49];

8. Разработанная тест-система «БиоЛактам» может применяться для оценки уровня продукции бета-лактамаз клиническими изолятами бактерий в бактериальных суспензиях. При уровне бета-лактамазной активности бактериальной

суспензии $\geq 14,2\%$ рекомендуется остановить выбор на ингибитор-защищенных бета-лактамах либо цефалоспорилах 3-4 поколения, при уровне активности $\geq 26,5\%$ – на цефалоспорилах 3-4 поколения либо карбапенемах, а при активности, превышающей 81,2%, использование бета-лактамов нецелесообразно. Предложенный метод анализа сопоставим по результативности с диско-диффузионным, но существенно дешевле, обладает более высокой точностью и воспроизводимостью и, кроме того, позволяет выполнять исследования значительно быстрее (за 45-60 минут) [1, 28, 48];

9. Применение тест-системы «БиоЛактам» в клинических условиях является экономически эффективным. Общая экономия от применения тест-системы «БиоЛактам» в расчете на 1000 пролеченных пациентов с бактериальными инфекциями и высокой бета-лактамазной активностью сыворотки крови составляет 235.300 у.е., коэффициент экономической эффективности – 42,8. Общая экономия от применения тест-системы «БиоЛактам» в расчете на 1000 пролеченных пациентов с бактериально-воспалительными поражениями ЦНС и высокой бета-лактамазной активностью СМЖ составляет 295.500 у.е., коэффициент экономической эффективности – 53,7 [1, 2, 5, 34, 37].

Рекомендации по практическому использованию результатов

Анализ результатов настоящего исследования позволяет нам предложить следующие рекомендации по их практическому использованию (в скобках приведена оценка степени доказательности рекомендаций [J. Giesecke, 2002]):

1. Разработанная тест-система «БиоЛактам» может успешно использоваться в клинической и лабораторной практике для качественной и количественной оценки уровня бета-лактамазной активности сыворотки крови, мокроты, спинномозговой жидкости и бактериальных суспензий (B II);

2. У пациентов с высокой (39°C и выше) лихорадкой, чья сыворотка крови обладает выраженной собственной бета-лактамазной активностью (60% и более), используемые дозировки бензилпенициллина, цефалексина и имипенема необходимо увеличивать минимум на 25%, либо использовать для проведения антибактериальной терапии таким пациентам ингибитор-защищенные препараты бета-лактамов, желательно – содержащие клавулановую кислоту, а не тазобактам либо сульбактам (например, амоксициллин/ клавуланат) (C II);

3. В случае выявления высокой (более 20%) бета-лактамазной активности мокроты у конкретного пациента состав проводимой ему антибактериальной терапии должен учитывать возможное снижение эффективности бета-лактамовых препаратов: следует назначать либо антибиотики, высокоустойчивые к бета-лактамазам бактерий (карбапенемы, монобактамы, цефалоспорины 4-го поколения, ингибитор-защищенные бета-лактамы), либо препараты из других

фармакологических групп (макролиды, гликопептиды, оксазолидиноны, фторхинолоны, аминогликозиды, линкозамиды и т.п.) (В II);

4. В случае выявления высокой (более 20%) бета-лактамазной активности СМЖ у конкретного пациента с бактериальным менингитом либо менингоэнцефалитом состав проводимой ему антибактериальной терапии должен учитывать возможное снижение эффективности бета-лактамов препаратов: следует назначать либо антибиотики, высокоустойчивые к бета-лактамазам бактерий (карбапенемы, монобактамы, цефалоспорины 4-го поколения), либо препараты из других фармакологических групп (гликопептиды, оксазолидиноны, фторхинолоны, аминогликозиды, рифамицины, хлорамфеникол и т.п.). Ингибитор защищенные бета-лактамы также могут оказаться эффективными (В II);

5. Оценка бета-лактамазной активности СМЖ может быть использована как дополнительный диагностический тест для выявления субарахноидальных кровоизлияний, особенно в случае, если с момента кровоизлияния прошло значительное время, и эритроциты в ликворе полностью разрушились (С II);

6. Разработанная тест-система «БиоЛактам» может быть использована для оценки устойчивости клинических изолятов патогенных микроорганизмов к антибиотикам бета-лактамов ряда. Она оптимальна для определения уровня продукции бета-лактамаз энтеробактериями, ограниченно применима для определения устойчивости к бета-лактамам грам(+) кокков и не позволяет напрямую дифференцировать обычные бета-лактамазы от БЛРС (А I);

7. При уровне бета-лактамазной активности бактериальной суспензии, равном или превышающем 14,2%, рекомендуется включать в состав проводимой антибактериальной терапии ингибитор-защищенные бета-лактамовые препараты, цефалоспорины 3-4 поколений либо карбапенемы (В I);

8. При уровне бета-лактамажной активности бактериальной суспензии, равном или превышающем 26,5%, рекомендуется исключить из состава антибактериальной терапии ингибитор-защищенные бета-лактамовые препараты и назначать только цефалоспорины 3-4 поколений либо карбапенемы (С II);

9. При уровне бета-лактамажной активности бактериальной суспензии, равном или превышающем 81,2%, рекомендуется назначать только карбапенемы, монобактамы либо препараты из других фармакологических групп с аналогичным спектром активности (С II);

12. Совместное использование тест-системы «БиоЛактам» и диско-диффузионного метода анализа позволяет выявить наличие у клинических изолятов патогенных микроорганизмов неферментативной устойчивости к бета-лактамовым антибиотикам, в том числе – метициллинорезистентности (А I).

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ СОИСКАТЕЛЯ

Монография

1. Жильцов, И.В. Устойчивость к бета-лактамам антибиотикам: природа и клиническое значение (монография) / И.В. Жильцов, В.М. Семенов, Т.И. Дмитриченко // Витебск: издательство ВГМУ. – 2011. – 187 с.

Статьи в журналах

2. Бактериальные менингиты: новые подходы к диагностике и лечению / В.М. Семенов, С.К. Зенькова, И.В. Жильцов, И.С. Веремей, М.А. Васильева // Сборник научных трудов Главного военно-медицинского клинического центра «ГВКГ» МО Украины «Современные аспекты военной медицины». – Киев, 2011. – Выпуск 18. – с. 565-575.

3. Бета-лактамазная активность белков человеческой крови: новый взгляд на патогенез антибиотикоустойчивости / И.В. Жильцов, И.С. Веремей, В.М. Семенов, И.И. Генералов, Е.Н. Полешук // Иммунопатол., алергол., инфектол. – 2008. – №2. – с. 77-83.

4. Бета-лактамазная активность белков человеческой крови: новый взгляд на патогенез антибиотикоустойчивости с позиций эндозоологии / И.В. Жильцов, И.С. Веремей, В.М. Семенов, И.И. Генералов, Е.Н. Полешук // Экология человека. – 2009. – №3. – с. 55-59.

5. Бета-лактамазная активность ликвора – одна из причин неэффективности антибиотикотерапии бактериальных поражений ЦНС / И.В. Жильцов, И.С. Веремей, В.М. Семенов, С.К. Зенькова, М.А. Васильева // Вестник Витебского государственного медицинского университета. – 2011. – Том 10, №3. – с. 112-119.

6. Высокая бета-лактамазная активность мокроты как прогностический фактор неудачи антибактериальной терапии пневмоний и ХОБЛ / И.В. Жильцов, И.С. Веремей, В.М. Семенов, С.Ю. Шаталов, А.В. Курьянович, В.А. Малиновский // Вестник Витебского государственного медицинского университета. – 2011. – Том 10, №3. – с. 120-127.

7. Жильцов, И.В. Выявление абзимов с пенициллиназной активностью в сыворотке крови больных шигеллезами / И.В. Жильцов, И.И. Генералов, В.М. Семенов // Иммунопатология, алергология, инфектология. – 2004. – №3 – с. 90-93.

8. Жильцов, И.В. Особенности «биологической» антибиотикоустойчивости при шигеллезах: выявление *in vivo* поликлональных IgG, обладающих пенициллиназной активностью / И.В. Жильцов, В.М. Семенов, И.И. Генералов // Медицинская панорама. – Минск. – 2006. – №5. – с. 46-48.

9. Жильцов, И.В. Особенности толерантности к бета-лактамам при инфекционной патологии: выявление *in vivo* поликлональных IgG, обладающих пенициллиназной активностью / И.В. Жильцов, И.И. Генералов, В.М. Семенов // Медицинская панорама. – Минск. – 2006. – №5. – с. 92-95.
10. Исследование природы бета-лактамазной активности сыворотки крови / И.В. Жильцов, И.С. Веремей, В.М. Семенов, И.И. Генералов, С.К. Егоров // Иммунопатол., аллергол., инфектол. – 2011. – №3. – с. 17-23.
11. Кинетика распада некоторых бета-лактамовых антибиотиков под воздействием человеческого сывороточного альбумина / И.В. Жильцов, Д.В. Моисеев, В.М. Семенов, С.К. Егоров // Вестник фармации. – 2011. – №3 (53). – с. 73-80.
12. Клинико-патогенетическое значение бета-лактамазной активности сыворотки крови больных и здоровых лиц / И.В. Жильцов, И.С. Веремей, В.М. Семенов, С.М. Логвиненко // Военная медицина. – 2011. – №4 (21). – с. 40-44.
13. Клинические особенности бета-лактамазной активности сыворотки крови человека / И.В. Жильцов, И.С. Веремей, В.М. Семенов, И.И. Генералов, С.К. Егоров // Проблемы здоровья и экологии. – 2011. – №3 (29). – с. 35-39.
14. Клинические особенности бета-лактамазной активности сыворотки крови человека / И.В. Жильцов, И.С. Веремей, В.М. Семенов, И.И. Генералов, С.К. Егоров // Сборник научных трудов Главного военно-медицинского клинического центра «ГВКГ» МО Украины «Современные аспекты военной медицины». – Киев, 2011. – Выпуск 18. – с. 469-477.
15. Механизм гидролиза бета-лактамовой связи под воздействием альбумина / И.В. Жильцов, И.С. Веремей, В.М. Семенов, И.И. Генералов, С.К. Егоров // Иммунопатол., аллергол., инфектол. – 2011. – №3. – с. 24-31.
16. Особенности бета-лактамазной активности сыворотки крови больных аденовирусной инфекцией, острым гнойным тонзиллитом, серозными и гнойными менингитами / И.В. Жильцов, И.С. Веремей, В.М. Семенов, И.И. Генералов // Вестник Витебского государственного медицинского университета. – 2009. – Том 8, №3. – с. 118-129.
17. Особенности бета-лактамажной активности сыворотки крови больных рожей и пневмонией / И.В. Жильцов, И.С. Веремей, В.М. Семенов, И.И. Генералов // Вестник Витебского государственного медицинского университета. – 2009. – Том 8, №1. – с. 58-67.
18. Особенности взаимодействия антибиотиков бета-лактамового ряда с человеческим сывороточным альбумином / И.В. Жильцов, И.С. Веремей, В.М. Семенов, И.И. Генералов, С.К. Егоров, Е.Н. Полешук, М.А. Васильева, С.В. Семенов // Сборник научных трудов Главного военно-медицинского клинического центра «ГВКГ» МО Украины «Современные аспекты военной медицины». – Киев. – 2010. – Выпуск 16. – с. 133-140.

19. Подходы к определению бета-лактамазной реактивности макроорганизма: способы выполнения и их сравнительная характеристика / И.С. Веремей, И.В. Жильцов, В.М. Семенов, И.И. Генералов, Е.Н. Полешук // Иммунопатол., аллергол., инфектол. – 2008. – №3. – с. 49-54.

20. Предварительный анализ природы факторов сыворотки человеческой крови, обладающих бета-лактамазной активностью / И.С. Веремей, И.В. Жильцов, В.М. Семенов, И.И. Генералов, С.К. Егоров, Е.Н. Полешук // Иммунопатол., аллергол., инфектол. – 2008. – №4. – с. 75-81.

21. Природа бета-лактамазной активности сыворотки крови: структура активного центра альбумина / И.В. Жильцов, И.С. Веремей, В.М. Семенов, И.И. Генералов, С.К. Егоров // Медицинская панорама: рецензируемый научно-практический журнал для врачей и деловых кругов медицины. – Минск. – 2011. – №7 (124). – с. 49-54.

22. Природа бета-лактамазной активности сыворотки человеческой крови / И.В. Жильцов, И.С. Веремей, В.М. Семенов, И.И. Генералов, С.К. Егоров // Медицинская панорама: рецензируемый научно-практический журнал для врачей и деловых кругов медицины. – Минск. – 2011. – №7 (124). – с. 31-35.

23. Распад антибиотиков бета-лактаманного ряда под воздействием сывороточного альбумина / И.В. Жильцов, И.С. Веремей, В.М. Семенов, И.И. Генералов, С.К. Егоров // Медицинская панорама: рецензируемый научно-практический журнал для врачей и деловых кругов медицины. – Минск. – 2011. – №7 (124). – с. 39-42.

24. Распад бета-лактамных антибиотиков под воздействием нативной сыворотки крови и человеческого сывороточного альбумина / И.В. Жильцов, Д.В. Моисеев, В.М. Семенов, С.К. Егоров // Проблемы здоровья и экологии. – 2011. – №3 (29). – с. 31-35.

25. Распад некоторых бета-лактамных антибиотиков под воздействием нативной сыворотки крови и человеческого сывороточного альбумина / И.В. Жильцов, Д.В. Моисеев, В.М. Семенов, С.К. Егоров // Сборник научных трудов Главного военно-медицинского клинического центра «ГВКГ» МО Украины «Современные аспекты военной медицины». – Киев, 2011. – Выпуск 18. – с. 477-485.

26. Семенов, В.М. Микробиологические и биологические аспекты резистентности к антимикробным препаратам / В.М. Семенов, Т.И. Дмитраченко, И.В. Жильцов // Мед. новости. – 2004. – №2. – с. 10-17.

27. Сравнительная оценка двух методик определения бета-лактамазной активности в биологических жидкостях / И.В. Жильцов, И.С. Веремей, В.М. Семенов, И.И. Генералов // Вестник ВГМУ. – 2010. – Том 9, №4. – с. 6-11.

28. Тест-система «БиоЛактам» – эффективное средство для выявления бактерий, устойчивых к антибиотикам бета-лактаманного ряда / И.В. Жильцов, И.С. Веремей, В.М. Семенов, Е.Л. Небосько // Вестник Витебского государственного медицинского университета. – 2011. – Том 10, №4. – с. 98-104.

Материалы конференций и сборники научных трудов

29. «Биологическая» резистентность к антибактериальным препаратам: роль альбумина / И.В. Жильцов, И.С. Веремей, В.М. Семенов, И.И. Генералов, С.К. Егоров // «Инфекционные заболевания: достижения и проблемы в диагностике и терапии» (Материалы VIII съезда инфекционистов Украины, Винница, 6-8 октября 2010 г.). – Тернополь, ТДМУ «Укрмедкнига». – 2010. – С. 366-368.

30. Клиническое значение бета-лактамазной активности белков человеческой крови / И.В. Жильцов, И.С. Веремей, В.М. Семенов, И.И. Генералов, С.К. Егоров // «Инфекционные заболевания: достижения и проблемы в диагностике и терапии» (Материалы VIII съезда инфекционистов Украины, Винница, 6-8 октября 2010 г.). – Тернополь, ТДМУ «Укрмедкнига». – 2010. – с. 368-370.

31. Бета-лактамазная активность мокроты у пациентов с пневмониями / И.В. Жильцов, В.В. Скворцова, Д.Е. Шаряков, А.М. Хныков, В.М. Семенов // «Достижения фундаментальной, клинической медицины и фармации» (Материалы 67-й научной сессии сотрудников ВГМУ, 2-3 февраля 2012 г.). – Витебск, 2012. – с. 79-81.

32. Исследование природы бета-лактамазной активности сыворотки крови человека / И.В. Жильцов, И.С. Веремей, В.М. Семенов, И.И. Генералов, С.К. Егоров // Сборник материалов конференции «Достижения фундаментальной, клинической медицины и фармации» (65-я научная сессия сотрудников ВГМУ, 24-25 марта 2010 г.). – Витебск. – 2010. – с. 189-192.

33. Определение β -лактамажной реактивности макроорганизма неокупроиновым методом / И.В. Жильцов, И.С. Веремей, А.М. Моисеева, Е.Н. Полешук // Актуальные вопросы современной медицины и фармации. Материалы 60-й итоговой научно-практической конференции студентов и молодых ученых ВГМУ, 24-25 апреля 2008 г. – Витебск. – 2008. – с. 270-272.

34. Определение клинически значимых показателей бета-лактамазной активности сыворотки крови / И.В. Жильцов, И.С. Веремей, В.М. Семенов, В.В. Скворцова // «Достижения фундаментальной, клинической медицины и фармации» (Материалы 66-й научной сессии сотрудников ВГМУ, 27-28 января 2011 г.). – Витебск. – 2011. – с. 126-128.

35. Определение молярных показателей поглощения некоторых бета-лактаманых антибиотиков, используемых для определения бета-лактамазной активности / И.С. Веремей, И.В. Жильцов, И.И. Генералов, Е.Н. Полешук //

Актуальные вопросы современной медицины и фармации. Материалы 60-й итоговой научно-практической конференции студентов и молодых ученых ВГМУ, 24-25 апреля 2008 г. – Витебск. – 2008. – с. 262-264.

36. Сравнительный анализ двух методов определения бета-лактамазной активности биологических объектов / И.В. Жильцов, И.С. Веремей, В.М. Семенов, И.И. Генералов, Т.И. Дмитраченко, Н.В. Василенко, Н.Ф. Акулич, Д.Н. Лавринович, Н.В. Ляховская, С.К. Зенькова, И.И. Стахович, М.А. Васильева, С.В. Семенов, О.Я. Перевалов, Н.С. Говорушкина // Сборник материалов конференции «Достижения фундаментальной, клинической медицины и фармации» (65-я научная сессия сотрудников ВГМУ, 24-25 марта 2010 г.). – Витебск. – 2010. – с. 187-189.

Тезисы докладов

37. Бета-лактамазная активность ликвора: методика определения и интерпретация / И.В. Жильцов, В.М. Семенов, С.К. Зенькова, М.А. Васильева, К.М. Кубраков // «Достижения фундаментальной, клинической медицины и фармации» (Материалы 67-й научной сессии сотрудников ВГМУ, 2-3 февраля 2012 г.). – Витебск, 2012. – с. 78-79.

38. Бета-лактамазная активность плазмы крови больных рожей / И.В. Жильцов, И.С. Веремей, В.М. Семенов, И.И. Генералов, Е.Н. Полешук // Инфекционные болезни: современные проблемы диагностики и лечения. Материалы российской научно-практической конференции. СПб., ВМА, 3-4 декабря 2008 г. – СПб. – 2008. – с. 82.

39. Бета-лактамазная активность сыворотки крови человека: клинические аспекты / И.В. Жильцов, И.С. Веремей, В.М. Семенов, И.И. Генералов, С.К. Егоров // Материалы Первого конгресса Евро-Азиатского общества по инфекционным болезням. Журнал инфектологии. – 2010. – Том 2, №4. – с. 66.

40. Жильцов, И.В. Биологическая антибиотикорезистентность в клинике инфекционных болезней / И.В. Жильцов, И.И. Генералов // Достижения фундаментальной клинической медицины и фармации: Тезисы докладов 59-й научной сессии университета, посвященной 70-летию ВГМУ, 26-27 февраля 2004 года. – Витебск. – 2004. – с. 123-124.

41. Некоторые биологические аспекты антибиотикорезистентности животных и человека / И.С. Веремей, В.М. Семенов, И.В. Жильцов, С.В. Семенов, Е.Н. Полешук, С.К. Егоров // «Достижения фундаментальной, клинической медицины и фармации» (Материалы 66-й научной сессии сотрудников ВГМУ, 27-28 января 2011 г.). – Витебск. – 2011. – с. 54-55.

42. Необычно высокий уровень распада антибиотиков бета-лактамной группы в человеческой плазме и сыворотке крови / И.В. Жильцов, И.С. Вер-

мей, В.М. Семенов, И.И. Генералов // Материалы Евро-Азиатского Конгресса по инфекционным болезням. – Витебск. – 2008. – Том 1. – с. 85-86.

43. О возможности использования некоторых β -лактамных антибиотиков в качестве тест-объектов для определения β -лактамазной реактивности макроорганизма / И.С. Веремей, И.В. Жильцов, В.М. Семенов, И.И. Генералов, Е.Н. Полешук // Материалы Евро-Азиатского Конгресса по инфекционным болезням. – Витебск. – 2008. – Том 1. – с. 179-180.

44. Оптимизация условий для определения β -лактамазной реактивности макроорганизма неокупроиновым методом / В.М. Семенов, И.С. Веремей, И.В. Жильцов, И.И. Генералов, Е.Н. Полешук // Материалы Евро-Азиатского Конгресса по инфекционным болезням. – Витебск. – 2008. – Том 1. – с. 192-193.

45. Особенности бета-лактамазной активности человеческого сывороточного альбумина / И.В. Жильцов, И.С. Веремей, В.М. Семенов, И.И. Генералов, С.К. Егоров // Материалы Первого конгресса Евро-Азиатского общества по инфекционным болезням. Журнал инфектологии. – 2010. – Том 2, №4. – с. 66-67.

46. Природа бета-лактамазной активности сыворотки крови / И.В. Жильцов, И.С. Веремей, В.М. Семенов, И.И. Генералов, С.К. Егоров // Материалы Первого конгресса Евро-Азиатского общества по инфекционным болезням. Журнал инфектол. – 2010. – Том 2, №4. – с. 67-68.

47. Феномен эффективного распада бета-лактамных антибиотиков в крови больных некоторыми инфекционными заболеваниями / И.В. Жильцов, И.С. Веремей, В.М. Семенов, И.И. Генералов // Сборник тезисов V Международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы диагностики, лечения и профилактики инфекционных и паразитарных заболеваний» (Узбекистан). – Ташкент. – 2009. – с. 130-131.

Инструкции по применению

48. Использование метода двойных дисков для идентификации внутрибольничных штаммов *S. typhimurium*, продуцирующих бета-лактамазы расширенного спектра / Т.И. Дмитраченко, Е.В. Крылова, С.К. Зенькова, В.М. Семенов, И.В. Жильцов; утв. Министерством здравоохранения Республики Беларусь 11.06.2009 г., рег. № 036-0409. – Минск: Дикта, 2009. – 6 с.

49. Определение бета-лактамазной активности сыворотки крови больных: инструкция по применению / И.В. Жильцов, И.С. Веремей, В.М. Семенов, С.К. Зенькова; утв. Министерством здравоохранения Республики Беларусь 11.06.2009 г., рег. № 035-0409. – Минск: Дикта, 2009. – 10 с.

РЭЗІЮМЭ

Жыльцоў Іван Віктаравіч

Біялагічная рэзістэнтнасць да бэта-лактамных антыбіётыкаў пры сацыяльна значных інфекцыйных захворваннях бактэрыяльнай прыроды: механізмы, клінічнае значэнне і шляхі пераадолення

Ключавыя словы: бэта-лактамазная актыўнасць, сыраватка крыві, альбумін, макрота, ліквар, патагенныя мікраарганізмы, антыбіётыкаўстойлівасць.

Мэта працы: ацаніць клінічнае значэнне біялагічнай рэзістэнтнасці да бэта-лактамных антыбіётыкаў пры сацыяльна значных інфекцыйных захворваннях для аптымізацыі антыбактэрыяльнай тэрапіі.

Метады даследавання: клінічныя, мікрабіялагічныя, імуналагічныя, біяхімічныя, статыстычныя, матэматычнае мадэляванне.

Атрыманыя вынікі і іх навуковая навізна: упершыню паказана, што ў значнай частцы пацыентаў з сацыяльна значнымі інфекцыйнымі захворваннямі рэгіструецца высокі ўзровень бэта-лактамазнай актыўнасці сыраваткі крыві, які аказвае негатыўны ўплыў на эфектыўнасць тэрапіі антыбіётыкамі бэта-лактамнага шэрагу. Дадзеная актыўнасць на 70-90% абумоўлена ўласцівасцямі чалавечага сыраватчнага альбуміна, на 10-30% – полікланальных IgG субкласаў 1, 2 і 4. Бэта-лактамазная актыўнасць сыраваткі крыві выяўляецца ў дачыненні да ўсіх класаў бэта-лактамных антыбіётыкаў, але інгібіруецца клавулановай кіслотой і, у меншай ступені, тазабактамам; яе выяўленасць прама прапарцыянальная ўзроўню распаду нітрацефіну.

Бэта-лактамазная актыўнасць макроты і спіннамазгавой вадкасці $\geq 20\%$ значна павялічвае верагоднасць няўдачы эмпірычнай антыбіётыкатэрапіі пнеўманій і бактэрыяльных нейраінфекцый ў 1,9-3,2 разу; у абодвух выпадках неабходна змена антыбактэрыяльнай тэрапіі. Пры бэта-лактамазнай актыўнасці сыраваткі крыві $\geq 68,2\%$ рэкамендуецца прызначэнне інгібітар-абароненых бэта-лактамаў альбо антыбіётыкаў з іншых груп з такім самым спектрам актыўнасці. Пры бэта-лактамазнай актыўнасці бактэрыяльнай завасі $\geq 14,2\%$ рэкамендуецца выкарыстоўваць інгібітар-абароненыя бэта-лактамы альбо цэфаласпарыны 3-4 пакаленняў, пры ўзроўні актыўнасці $\geq 26,5\%$ – цэфаласпарыны 3-4 пакаленняў альбо карбапенэмы, а пры актыўнасці, якая перавышае 81,2%, прымяненне бэта-лактамных прэпаратаў немэтазгодна.

Выкарыстанне вынікаў: распрацаваны метады аптымізацыі антыбактэрыяльнай тэрапіі ў пацыентаў з сацыяльна значнымі бактэрыяльнымі інфекцыямі ў залежнасці ад узроўню бэта-лактамазнай актыўнасці іх біялагічных асяроддзяў і паталагічных эксудатаў.

Вобласць ужывання: інфекцыйныя хваробы, тэрапія, неўралогія.

РЕЗЮМЕ

Жильцов Иван Викторович

Биологическая резистентность к бета-лактамам антибиотикам при социально значимых инфекционных заболеваниях бактериальной природы: механизмы, клиническое значение и пути преодоления

Ключевые слова: бета-лактамазная активность, сыворотка крови, альбумин, мокрота, ликвор, патогенные микроорганизмы, антибиотикоустойчивость.

Цель работы: оценить клиническое значение биологической резистентности к бета-лактамам антибиотикам при социально значимых инфекционных заболеваниях для оптимизации антибактериальной терапии.

Методы исследования: клинические, микробиологические, иммунологические, биохимические, статистические, математическое моделирование.

Полученные результаты и их научная новизна: впервые показано, что у значительной части пациентов с социально значимыми инфекционными заболеваниями регистрируется высокий уровень бета-лактамазной активности сыворотки крови, оказывающий негативное влияние на эффективность терапии антибиотиками бета-лактаминового ряда. Даная активность на 70-90% обусловлена свойствами человеческого сывороточного альбумина, на 10-30% – поликлональных IgG субклассов 1, 2 и 4. Бета-лактамазная активность сыворотки крови проявляется в отношении всех классов бета-лактамов антибиотиков, но ингибируется клавулановой кислотой и, в меньшей степени, тазобактамом; ее выраженность прямо пропорциональна уровню распада нитроцефина.

Бета-лактамазная активность мокроты и спинномозговой жидкости $\geq 20\%$ значительно увеличивает вероятность неудачи эмпирической антибиотикотерапии пневмоний и бактериальных нейроинфекций в 1,9-3,2 раза; в обоих случаях необходима смена антибактериальной терапии. При бета-лактамажной активности сыворотки крови $\geq 68,2\%$ рекомендуется назначение ингибитор-защищенных бета-лактамов либо антибиотиков из других групп со сходным спектром активности. При бета-лактамажной активности бактериальной суспензии $\geq 14,2\%$ рекомендуется использовать ингибитор-защищенные бета-лактамы либо цефалоспорины 3-4 поколения, при уровне активности $\geq 26,5\%$ – цефалоспорины 3-4 поколения либо карбапенемы, а при активности, превышающей 81,2%, применение бета-лактамов препаратов нецелесообразно.

Использование результатов: разработан метод оптимизации антибактериальной терапии у пациентов с социально значимыми бактериальными инфекциями в зависимости от уровня бета-лактамажной активности их биологических сред и патологического отделяемого.

Область применения: инфекционные болезни, терапия, неврология.

SUMMARY

Zhylytsou Ivan Viktorovich

**Biological resistance to beta-lactam antibiotics
in socially important infectious diseases of bacterial origin:
mechanisms, clinical significance and ways of overcoming**

Key words: beta-lactamase activity, blood serum, albumin, sputum, cerebrospinal fluid, pathogenic microorganisms, antibiotic resistance.

Aim of study: to evaluate the clinical significance of biological resistance to beta-lactam antibiotics in socially important infectious diseases for the optimization of antibacterial therapy.

Methods of research: clinical, microbiological, immunological, biochemical, statistical, mathematic modeling.

Results and their scientific novelty: it was demonstrated for the first time that a number of patients with socially important infectious diseases is characterized by high levels of beta-lactamase activity of their blood serum negatively influencing the efficacy of therapy with antibiotics of beta-lactam group. This activity is 70-90% mediated by unique properties of human serum albumin, and 10-30% – by the properties of polyclonal IgG of 1, 2 and 4 subclasses. Beta-lactamase activity of blood serum is valid for all classes of beta-lactam antibiotics but may be inhibited by clavulanic acid and (less effectively) by tazobactam; the level of this activity is in direct proportion to the level of nitrocefin decay.

The level of beta-lactamase activity of sputum and cerebrospinal fluid $\geq 20\%$ is reliably associated with 1,9-3,2-fold increase in probability of fail of empiric antibacterial treatment of pneumonia and bacterial neuroinfections respectively; both cases demand the change of antibacterial therapy. If the level of beta-lactamase activity of blood serum exceeds or equal to 68,2% it's recommended to prescribe the inhibitor-protected beta-lactams or antibacterials from other groups with the similar spectrum of activity. If the level of beta-lactamase activity of bacterial suspension is $\geq 14,2\%$ we recommend to use the inhibitor-protected beta-lactams or 3-4th generation cephalosporins; if the level of activity is $\geq 26,5\%$ one should better use the 3-4th generation cephalosporins or carbapenems; finally, if the level of activity exceeds 81,2% the use of beta-lactam antibacterial preparations is inexpedient.

Usage of results: we have developed the method of optimization of antibacterial therapy in patients with socially important bacterial infections according to the levels of beta-lactamase activity of their biological fluids and pathologic secrets.

Field of use: infectious diseases, general therapy, neurology.

Библиотека ВГМУ



Подписано в печать «15» ноября 2012 г. Формат 60×84 1/16.

Бумага типографская №2. Гарнитура Times Усл. печ. листов 2,38

Уч.-изд. л. 2,56 Тираж 60 экз. Заказ № 940

Издатель и полиграфическое исполнение

УО «Витебский государственный медицинский университет»

ЛИ № 02330/0549444 от 8.04.2009 г.

Отпечатано на ризографе в Витебском государственном медицинском университете.

210023, г. Витебск, Фрунзе, 27

Тел. +375 (212) 26-19-66